Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg

Direktor: Prof. Dr. K. Kochsiek

EINFLUSS EINER EXPERIMENTELL ERZEUGTEN AKUTEN URÄMIE BEI RATTEN AUF DIE UTILISIERUNG VON KETOLEUCIN.

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Reinhard Müller

aus Halle an der Saale

Würzburg, 13. April 1981

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg

Direktor: Prof. Dr. K. Kochsiek

EINFLUSS EINER EXPERIMENTELL ERZEUGTEN AKUTEN URÄMIE BEI RATTEN AUF DIE UTILISIERUNG VON KETOLEUCIN.

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Reinhard Müller

aus Halle an der Saale

Würzburg, 13. April 1981

Referent: Prof. Dr. A. Heidland

Korreferent: Prof. Dr. K. Kochsiek

Dekan: Prof. Dr. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 2o.11.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

Inhaltsverzeichnis: Seite

EINLEITUNG 1

I. Definition der Urämie 1

II. Ätiologie der Urämie 1

III. Prophylaxe und Therapie des akuten Nierenversagens 1

IV. Krankenhauskosten bei Patienten mit akuten Nierenversagen 2

V. Auswirkung der akuten Urämie auf den Proteinstoffwechsel 2

VI. Auswirkungen der akuten Urämie auf den Kohlenhydratstoffwechsel 4

VII. Fragestellung der Arbeit 6

METHODIK 7

1. Versuchsdurchführung bis zur Organgewinnung 7

2. Bestimmung von Lactat, Pyruvat, Citrat und α-Ketoglutarat im Plasma nach Bergmeyer 8

3. Bestimmung von Glykogen und Gesamtkohlenhydrat nach Montgomery 9

4. Bestimmung des Proteingehaltes der Organproben nach Lowry et al. 1o

5. Bestimmung von Phosphat (nach Fiske und Subbarow), Phosphorylase a, Phosphorylase b (in Muskel und Herz nach Hedrick und Fischer, in Leber und Nieren nach Stalmans und Hers) 11

6. Bestimmung der Glykogensynthese nach Thomas et al. 12

7. Bestimmung von Harnstoff 13

Seite

ERGEBNISSE 14

DISKUSSION 38

ZUSAMMENFASSUNG 4o

LITERATURVERZEICHNIS 43

EINLEITUNG

I. Definition der Urämie

Das Wort Urämie leitet sich aus dem Griechischen ab und heißt wörtlich übersetzt Harnvergiftung. Als klinischer Begriff taucht er erstmalig im Jahre 184o bei Piorry und L'Hèritier (1) auf und bezeichnet ein klinisches Syndrom, welches sämtliche Symptome und Zeichen umfaßt, die durch eine fortgeschrittene globale Niereninsuffizienz verursacht werden.

II. Ätiologie der Urämie

Eine Urämie kann Folge jeder akuten oder chronischen Funktionsstörung der Niere entsprechenden Ausmaßes sein. Zu den wichtigsten auslösenden Erkrankungen gehören: Glomerulonephritis, Pyelonephritits, Zystenniere, vaskuläre Nephropathie, Nephrolithiasis, diabetische Nephropathie, Amyloidniere, hereditäre, chronische Nephritis, interstitielle Nephritis, Hypovolämie, Sepsis, Trauma, Rhabdomyolyse.

III. Prophylaxe und Therapie des akuten Nierenversagens

Um ein akutes Nierenversagen zu vermeiden, empfiehlt sich die Elimination möglicher nephrotoxischer Substanzen und eine Schockprophylaxe.
Die Therapie des akuten Nierenversagens beinhaltet im Wesentlichen den Ausgleich des Elektrolyt- und Flüssigkeits-, sowie des Säure-Basen-Haushaltes, die Steigerung der Diurese und eine hochkalorische Ernährung mit Substution essentieller und nichtessentieller Aminosäuren, um die Protein- und Kohlenhydratverluste auszugleichen. Sinkt die GFR unter 1o ml/min, so ist bei Harnstoff-N-Werten über 1oo mg/dl eine Dialysebehandlung unumgänglich. Die gefährlichsten Komplikationen bei Patienten mit akutem Nieren-

versagen sind Infektionen, vorwiegend die des Respirationstraktes, ferner gastrointestinale Blutungen.
Trotz verbesserter Möglichkeiten der Intensivmedizin und Dialysetechnik hat sich die Letalität des akuten Nierenversagens in den letzten Jahren nicht verringert, sondern ist im Gegenteil bei Hypovolämie und Sepsis auf über 80 Prozent angestiegen.
Das nephrotoxisch bedingte akute Nierenversagen hat eine relativ günstige Prognose, während die geringsten Überlebensraten bei Patienten mit akutem Nierenversagen nach Verbrennungen, Polytrauma und Bauchoperationen zu erwarten sind.

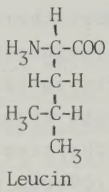
IV. Krankenhauskosten bei Patienten mit akuten Nierenversagen

Aus der Med. Klinik und Poliklinik Mainz liegen zum Problem der Behandlung von Patienten mit akuten Nierenversagen ausgiebige Studien vor (2). Hiernach haben sich die Pflegekosten für Patienten mit akuten Nierenversagen zwischen 1967 und 1975 verdoppelt, während die Verweildauer mit 37 bzw. 41 Tagen praktisch konstant geblieben ist. Vergleicht man die durchschnittlichen Tageskosten für Patienten mit akuten Nierenversagen mit dem übrigen Krankengut, so liegen die Kosten für Patienten mit akuten Nierenversagen etwa drei mal so hoch.
Therapeutisch sind bislang bahnbrechende Erfolge ausgeblieben, nachdem sich die optimistischen Befunde von Abel und Mitarbeiter (3) nicht haben reproduzieren lassen.

V . Auswirkung der akuten Urämie auf den Proteinstoffwechsel

Eine durch akute Niereninsuffizienz ausgelöste Urämie bedingt eine katabole Stoffwechsellage, die einen Eiweißabbau von bis zu 200 g täglich erreichen kann. Nachdem die Plasmaproteinreserven abgebaut sind, wird das Eiweiß aus den Enzymsystemen, insbesondere von Leber, Darmmukosa, Pankreas und natürlich der Muskulatur mobilisiert (4,5,6,7,).

Eine der bisher meist untersuchten Aminosäuren ist das Leucin. Sie gehört zu den verzweigtkettigen Aminosäuren und kann als essentielle Aminosäure vom menschlichen Organismus nicht synthetisiert werden.
Beim Urämiker wird häufig anstelle von Leucin das Ketoanaloge, nämlich Ketoisocapronsäure (Ketoleucin) substituiert. Die Strukturformel von Leucin ist nebenstehend abgebildet. Leucin wird zwar primär von der Leber aufgenommen, jedoch vorwiegend extrahepatisch oxydiert. Die Skelettmuskulatur spielt quantitativ in der Weiterverwertung des Leucins eine ganz wesentliche Rolle.



Leucin

Unter den proteinogenen Aminosäuren ist Leucin die einzige ketogene, das heißt, es entstehen bei ihrem Abbau Ketonkörper. Zuerst wird Leucin durch Transaminierung in Alpha-Ketiosocapronsäure umgewandelt. Diese Alpha-Ketosäure erfährt dann eine oxydative Decarboxylierung zu Isovaleryl-CoA. Hier besteht eine Analogie des Reaktionsablaufes zur oxydativen Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und von Alpha-Ketogluturat zu Succinyl-CoA. Unter Wasserstoffabspaltung wird das Isovaleryl-CoA in Beta-Methylcrotonyl-CoA überführt, wobei als Wasserstoffakzeptor das FAD dient. Unter Verbrauch von ATP entsteht dann unter Carboxylierung aus Beta-Methylcrotonyl-CoA Betamethyl-glutaconyl-CoA. Das letztgenannte Zwischenprodukt wird hydratisiert. Durch Spaltung entstehen schließlich Acetyl-CoA und Acetoacetat. Acetyl-CoA kann bekanntlich in den Zitronensäurezyklus aufgenommen werden.

Hinsichtlich einer möglichen Interaktion mit dem Blutzuckerspiegel nimmt Leucin eine Sonderstellung ein. Bereits vor Entwicklung der Insulinnachweise konnte eine leucinempfindliche Hypoglykämie nachgewiesen werden. Leucin stimuliert offensichtlich die pankreatogene Insulinfreisetzung. Kommt es zu einer pathologischen Anhäufung von Leucin und der da-

zugehörigen Alpha-Ketosäure, wie das zum Beispiel bei der Ahornsirupkrankheit der Fall ist, so resultieren daraus Schwachsinn, Krämpfe, und eine hohe Letalität. Nach vorangegangenen Untersuchungen von Hörl et al. (8) spielt die Niere eine Schlüsselrolle in der Utilisierung von Ketoleucin. Mit Ausnahme der laktierenden Mamma wurde in der Niere die höchste Umwandlungsrate von Leucin zu Acetoacetat gefunden (9-15).

Möglicherweise ist ein Anstieg von Alpha-Ketoglutarat nach Binephrektomie für die Hemmung der Rückbildung von Ketoleucin zu Leucin verantwortlich. Dies wiederum hat eine toxische Akumulation von Ketoleucin zur Folge. Lundholm und Schersten (16) konnten zeigen, daß hohe Leucindosen einen größeren Effekt hinsichtlich der Proteinsynthese in isolierten Organen haben, als unter physiologischen Bedingungen gemessen werden kann. Nach neueren Untersuchungen steuert die intrazelluläre Leucinkonzentration auch das Verhältnis zwischen Proteinabbau und Proteinsynthese. Sinkt der Leucinspiegel, zum Beispiel nach erhöhter Verbrennung, so kommt es zu einer verstärkten Proteolyse des Muskelproteins, bei Anstieg des Leucinspiegels dahingegen wird die Proteolyse gehemmt.

VI. Auswirkungen der akuten Urämie auf den Kohlenhydratstoffwechsel

Glykogen ist eine leicht zu mobilisierende Speicherform für Glukose. Besonders reich an Glykogen sind die Skelettmuskulatur und die Leber. Eine wichtige Stellgröße für den Glykogengehalt ist der Ernährungszustand. Der Leberglykogengehalt sinkt schon nach kürzeren Fastenperioden auf Minimalwerte ab. Die Glykogenkonzentration ist in der Leber höher, aber aufgrund der gesamten Masse wird im Skelettmuskel mehr Glykogen gespeichert. Bei der phosphorolytischen Spaltung von Glykogen entsteht Glukose-1-Phosphat, das durch die Phosphoglukomutase in Glukose-6-Phosphat umgewandelt wird. Die für die phosphorolytische Spaltung notwendige

Phosphorylase kommt im Skelettmuskel in zwei Formen vor. Einmal als sogenannte aktive Phosphorylase a und zum anderen als inaktive Phosphorylase b. Von der biochemischen Struktur ist die b-Form ein Dimer, die a-Form dagegen ursprünglich tetramer. Die Aktivierung der Phosphorylase b erfolgt über die Phosphorylierung eines spezifischen Serinrestes. Das hierfür notwendige Enzym, die Phosphorylase-Kinase wird wie die Phosphorylase durch Phosphorylierung in die aktive Form umgewandelt.

Die Aktivierung der Phosphorylase-Kinase hängt wesentlich von der intrazellulären Konzentration an zyklischen AMP und der Calciumionenkonzentration ab. Im Glykogenabbau lassen sich also im wesentlichen drei enzymatisch katalysierte Kontrollstufen erkennen. Bei der Glykogensynthese dahingegen sind zwei enzymatische Kontrollstufen wichtig. Die zum Glykogenaufbau nötige Glykogensynthetase kann Glukoseeinheiten nur dann abbauen, wenn die Polysaccharidkette bereits mehr als vier Einheiten enthält. Die Glykogensynthese wird unter Phosphorylierung in die "dependent form" (D-Form) umgewandelt. Für die Aktivität der D-Form ist eine hohe Glukose-6-Phosphat-Konzentration nötig. Da die entphosphorylierte Form des Enzymes nicht von Glukose-6-Phosphat abhängig ist, wird diese Form auch die "independent form" (I-Form) bezeichnet.

Durch Adrenalin wird deutlich der Glykogenabbau in der Muskulatur stimuliert, was in der Leber in geringerem Umfang geschieht. Die Leber zeigt eine größere Empfindlichkeit für Glukagon. Den Nachforschungen von Sutherland sind wichtige Kenntnisse hinsichtlich der Wirkung von Adrenalin und Glukagon über das cyclische AMP zu verdanken (17,18). Adrenalin wird von der Plasmamembran der Muskelzelle gebunden und stimuliert die Adenylcyclase. Diese wiederum katalysiert die Entstehung von cyclischen AMP. Das cyclische AMP aktiviert eine Proteinkinase. Die durch cyclisches AMP aktivierte Proteinkinase phosphoryliert sowohl die Phosphorylase-Kinase, als auch die Glykogensynthetase. Die akute Urämie führt zu einem Abbau von Leber- und Muskelglykogen bei

gleichzeitiger Aktivierung der hepatischen Glukoneogenese.

Nach Untersuchungen von Hörl et al. (19,2o,21), gelingt durch Substitution essentieller Aminosäuren und Ketosäuren nach bilateraler Nephrektomie in der Leber eine Stimulierung der Glykogensynthese. Dieser Effekt ist an der Skelettmuskulatur geringer ausgeprägt. Vor allem Serin erweist sich bei akuter Urämie als optimales Substrat für die Glukoneogenese der Leber und hat eine anabole Wirkung auf den Muskelglykogenstoffwechsel.

VII. Fragestellung der Arbeit

Ketoleucin hat sich in hoher Dosierung nach Binephrektomie im Gegensatz zu Versuchen an ureterligierten Ratten als außerordentlich toxisch erwiesen (8). Der Wirkungsmechanismus der Ketoleucintoxizität nach Binephrektomie ist bislang nicht geklärt. Denkbar wäre eine Hemmung der Ketoleucinutilisierung durch eine Anhäufung von Alpha-Ketoglutarat. Alpha-Ketoglutarat wird normalerweise bevorzugt in der renalen Glukoneogenese utilisiert.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es daher, den Effekt von o,1g/kg/24 h und 2g/kg/24 h Ketoleucin in Kombination mit einer hochkalorischen, proteinarmen Diät auf den Protein- und Glykogenstoffwechsel in Skelettmuskulatur, Leber, Herzmuskel und Nieren bei binephrektomierten und ureterligierten Ratten zu untersuchen. Parallel dazu sollten im Plasma Harnstoff-N, Lactat, Pyruvat, Citrat und Alpha-Ketogluturat bestimmt werden.

METHODIK

1. Versuchsdurchführung bis zur Organgewinnung

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 72 Wistarratten (Fa. Ivanovas, Kisslegg/Allgäu) mit einem Durchschnittsgewicht von 2oo g verwendet. Nach einer 24-stündigen Nüchternperiode erfolgte in Äthernarkose bei 36 Tieren, unter Schonung der Nebennieren, die bilaterale Nephrektomie. Bei den übrigen 36 Ratten wurden beidseits die Ureteren ligiert.

Das Operationsgebiet konnte von dorsal her über einen etwa 3 cm langen Hautschnitt und jeweils zwei etwa 2 cm lange Schnitte durch Muskellogen und Peritoneum erreicht werden. Die tiefe Wundschicht wurde mit jeweils zwei Nähten adaptiert. Der Verschluß der Haut erfolgte mit 6 Metallklammern. Postoperativ wurden die Ratten einzeln in Metallgitterboxen mit den Ausmaßen 3ox15x15 cm untergebracht. Gefüttert wurden die Ratten mittels Schlundsonde, das gewählte Fütterungsintervall betrug acht Stunden. Die Grundnahrung setzte sich für jedes Tier aus o,6 g Berodiät V (Fa. Boehringer, Ingelheim) und o,o8 mg Vit B_{12} pro Tag zusammen. Von den binephrektomierten Ratten erhielten 18 zu der Basisnahrung o,1 g/kg/Tag Ketoleucin, die restlichen 18 aber die 2o-fache Dosis an Ketoleucin, also 2,og/kg/Tag. In ebensolche Diätgruppen wurden auch die ureterligierten Ratten unterteilt.

Für die Organgewinnung wurden die eben erwähnten 4 Diätgruppen wiederum in jeweils 3 Untergruppen unterteilt. So wurden zum Beispiel aus der Diätgruppe mit o,1g/kg/Tag Ketoleucin nach Binephrektomie postoperativ 6 Tiere nach 12 h, 6 Tiere nach 28 h und die restlichen 6 Tiere nach 44 h mittels Narkoseüberdosierung getötet und folgende Organe sofort in flüssigem Stickstoff asserviert: Herz, Leber, Skelettmuskel. Bei den ureterligierten Ratten wurden zusätzlich die Nieren entnommen.

2. Bestimmung von Lactat, Pyruvat, Citrat und α -Ketoglutarat im Plasma nach Bergmeyer (23)

Für die Bestimmung von Lactat, Pyruvat, α -Ketoglutarat und Citrat wurde heparinisiertes Blut aus dem Retroorbitalvenenplexus verwendet. Die Entnahme erfolgte jeweils etwa 1 Minute vor Tötung der Tiere. Die Proben wurden jeweils mit 3o%iger eiskalter Perchlorsäure denaturiert und sofort in Eis bis zur Auswertung konserviert. Nach vorsichtigem Auftauen bei Zimmertemperatur wurde bei 6ooo rpm 2 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

Nach Neutralisation mit KOH wurde wiederum 2 Minuten zentrifugiert. Vom so gewonnenen Überstand wurden für die Bestimmung von Lactat 25 µl in eine Kyvette eingesetzt, der Rest in eine weitere für Pyruvat, α -Ketoglutarat und Citrat.

Zur Messung von Lactat diente ein Medium aus NAD und Glycin-Hydrazin-Puffer (pH 9,o). Nach Ablesen der Ausgangsextinktion E_o (Lactat) bei Filter 334 nm wurden den Kyvetten 1o µl LDH zugegeben, um nach 1 Stunde die Endextinktion E_1 (Lactat) zu erhalten.

Als Medium für Pyruvat, α -Ketoglutarat und Citrat wurde eine Lösung aus o,25 M Hepes-Puffer (pH 7,4), NADH, Malat-Dehydrogenase und H_2O eingesetzt. Nach Messen der E_o wieder bei Filter 334 nm wurden zur Bestimmung von Pyruvat 1o LDH (1:1o verdünnt) in die Kyvetten pipettiert und nach 15 Minuten die E_1 abgelesen. Zur Ermittlung von α -Ketoglutarat erfolgte die Zugabe von 1o µl GLDH (1:5 verdünnt) und nach weiteren 15 Minuten das Ablesen der E_2. Um Citrat zu erhalten, wurden 1o µl Citratlyase zugesetzt und nach 15 Minuten die Extinktion E_3 gemessen.

Die Berechnung hielt sich an die Formeln:

Pyruvat:	$E_o - E_1$ x Faktor
Lactat:	E1 (Lactat) - E_o (Lactat) x Faktor
α-Ketoglutarat:	$E_1 - E_2$ x Faktor
Citrat:	$E_2 - E_3$ x Faktor

Die Konzentrationen wurden jeweils in mmol/ml Blut angegeben.

3. Bestimmung von Glykogen und Gesamtkohlenhydrat nach Montgomery (24)

Für die Bestimmung von Glykogen, Gesamtkohlenhydraten sowie Protein mußte aus den entnommenen Organen zunächst ein Rohextrakt gewonnen werden. Hierzu wurden die Organe ausgewogen und das 2,5-fache an 4 mM EDTA-Lösung (pH 7,o) zugesetzt.

Danach folgte die Homogenisierung. Das so gewonnene Homogenat wurde bei 15ooo rpm in der Kühlzentrifuge (Sorvall) 1o Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand ergab den Rohextrakt (RE). 1 ml dieses RE wurde mit 1 ml 1o%iger Trichloressigsäure (TCA) versetzt und bei 0^{o} C 1o Minuten inkubiert. Danach folgte 1ominütige Zentrifugation bei 3ooo rpm, der Niederschlag wurde verworfen. Bis zu diesem Punkt verlief die Bestimmung von Glykogen und Gesamtkohlenhydrat parallel.

Zur Ermittlung des Glykogens wurde zu 1 ml des eben gewonnenen Überstandes 2,2 ml 96%iger Äthanol gegeben und die Proben 15 Minuten bei 4^{o} C inkubiert. Danach erfolgte wieder eine Zentrifugation für 1o Minuten bei 3ooo rpm. Der Überstand wurde weggekippt und das Reagenzglas an der Luft getrocknet. Zu dem erhaltenen Niederschlag wurden 2 ml aqua dest., dann o,2 ml 4o% Phenol und 5 ml konz. Schwefelsäure gegeben. Das Ganze wurde 3o Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen und dann die Extinktion bei einer Wellenlänge von 492 nm abgelesen.

Zur Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehaltes wurden 2o des Überstandes nach der oben beschriebenen TCA-Fällung verwendet. Wie bei der Glykogenbestimmung wurden auch hier Phenol und konz. Schwefelsäure zugegeben und die Mischung bis zur Ablesung der Extinktion 3o Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Auch hier wurde der Filter 492 nm verwendet.

Die Berechnung erfolgte nach den Formeln:

$$\text{Glykogen:} \quad \frac{\text{konz.Standard x Ext.Probe x 2x Verdünnung}}{\text{Ext. Standard}} \quad (\mu g/\text{ml RE})$$

$$\text{Gesamtkohlenh.:} \quad \frac{\text{konz.Standard x Ext.Probe x 1oo}}{\text{Ext. Standard x 1ooo}} \quad (mg/\text{ml RE})$$

4. Bestimmung des Proteingehaltes der Organproben nach Lowry et al. (25)

Zu dieser Untersuchung wurden folgende Lösungen verwendet:

Lösung A: 1 l o,1n NaOH und 2og wasserfreies Na_2CO_3

Lösung B: o,5% Kupfer-Sulfat x 5 H_2O

Lösung C: 1% Na-K-Tartrat

Lösung D: 48 ml der Lösung A, 1ml Lösung C, 1ml Lösung B

Lösung E: aqua dest: Folinlösung = 1:1

2o μl RE wurden in 1 ml aqua dest. gelöst. 5oo μl aus dieser Mischung wurden 5 ml der Lösung D zugesetzt. Nach genau 1o Minuten wurden 5oo μl der Lösung E hinzugegeben und die Extinktion nach 2o Minuten bei Filter 578 nm ermittelt.

Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$\frac{\text{Extinktion Probe x Konz.Standard x F}}{\text{Extinktion Standard x 1ooo}} = \text{mg/ml RE}$$

Bei Verwendung von 1o μl RE war F = 1oo

5. Bestimmung von Phospat (nach Fiske und Subbarow 26), Phosphorylase a, Phosphorylase b (in Muskel und Herz nach Hedrick und Fischer 27) in Leber und Nieren nach Stalmans und Hers (28).

Für diese Bestimmungen wurden an Reagenzien verwendet:

Pufferlösung bestehend aus: 1o ml 1 M Tris, 1 ml DTE o,5 M, 25 ml NaF 1M, ph 6,8, ad 5oo ml aqua dest.

ST: 2g Glykogen AMP-frei, 4o ml Maleinsäure, 25M, 5,64 g Glukose-1-Phosphat, ph 6,8, ad 1oo ml aqua dest.

CT: (Leber,Niere) 4o ml Maleinsäure o,25 M, 5,64 Glukose-1-Phosphat, 2 g Glykogen, 22,6g Na_2SO_4, pH 6,5, ad 1oo ml aqua dest.

STOP: 2ooo ml H_2O, 7,5 g Ammoniummolybdat, 2,7 ml SDS 1o%, 42 ml konz. H_2SO_4, dann ca. 65o ml aqua dest. (Endvolumen 27oo ml).

ANSA: 74,35 g $NaHSO_3$, 2,5g Na_2SO_3, 1,25g ANSA, ad 2ooo ml aqua dest.

Zur Bestimmung von Phosphat wurde der Rohextrakt 1:1o mit Pufferlösung verdünnt (1o µl RE in 9oµl Puffer). Diese Lösung wurde mit 4,5ml STOP und 25oµl ANSA versetzt. Nach 3o Minuten konnte die Extinktion bei Filter 578 nm abgelesen werden.

Zur Bestimmung von Phosphorylase a und b wurde 1:2o bzw. 1:5o mit Puffer verdünnter Rohextrakt verwendet. Die Reaktion lief in einem Wasserbad von 3o° C ab. Exakt 1o Minuten nach Zupipettieren von o,1 ml ST bzw. CT wurde die Reaktion durch 4,5 ml STOP-Reagenz und 25oµl ANSA unterbrochen. Die Ablesung der Extinktion erfolgte wie bei Phosphat nach 3o Minuten bei Filter 578 nm. Für die Umrechnung der Extinktionen wurden die Formeln verwendet:

Phosphat Mol/ml: $\frac{16ox\text{Ext. Probe x Verdünnung}}{\text{Ext. Standard}}$

Phosphorylase a bzw. b: $\frac{16ox\ (\text{Ext.Probe-Ext.Standard})x2oo}{\text{Ext.Phosphatstandard}} = X$

$\frac{X\text{-Ergebnis Phosphat}}{1o \times \text{mg/ml Protein}}$ = Phosphorylase a bzw. b in nmol/1min/mg Protein

6. Bestimmung der Glykogensynthese nach Thomas et al.(29)

25 Rohextrakt wurden zu 1oμl I-Mix und ebensoviel zu 1oμl D+I-Mix pipettiert. Diese Mischung wurde 5 Minuten bei 3o°C präinkubiert. Danach wurden 5oμl ^{3}H-UDP-Glukose (3,75 mM) zugesetzt und für weitere 6 Minuten bei 3o°C inkubiert. Daraufhin wurden 5oμl dieser Lösung auf Whatman-Filterplättchen pipettiert und das Ganze in 66% Äthanol (4°C) für 3o Minuten getaucht. Der Alkohol wurde dann ausgetauscht und die Proben weitere 15 Minuten stehengelassen. Nach 5 Minuten Inkubation im Acetonbad und Trocknen der Plättchen wurde jeder Probe 5 ml Rotiszinth 11 (Fa. Roth) zugesetzt. Nun folgte die Auszählung im Szintillationszähler. Die Umrechnung der pro Minute gezählten Impulse erfolgte nach der Formel:

$\frac{\text{Cpm (Probe) x 1071o}}{\text{Cpm (total) x 5 (Inkubationszeit}} =$ nmol/1 min/ml RE

Leerwert: Filterplättchen ohne Probe

Totalwert: 5oμl ^{3}H-UDP-Glukose

I-Mix: 4 ml 1o% Glykogen
4 ml o,625 M Tris/HCl, o,o125 M EDTA,
o,156 M $MgCl_2$, ph 7,6, 2 ml aqua dest.

D+I-Mix: Wie I-Mix, nur hier statt 2 ml aqua dest.
2 ml o,o625 M Glukose-6-Phosphat

In Gegenwart von I-Mix wird die aktive I-Form der Glykogensynthetase gemessen, mit dem D+I-Mix die Gesamtaktivität des Enzyms ermittelt.

7. Bestimmung von Harnstoff

Methode nach Berthelot (Testcombination Boehringer, Mannheim)

Folgende Lösungen wurden verwendet:

Lösung 1: Urease 1o U/ml und o,o5M Phosphatpuffer, pH 6,5

Lösung 2: 3 mg Harnstoff (1oo ml)

Lösung 3: o,1o6M Phenol und o,17mM Nitropussidnatrium

Lösung 4: 11mM Natriumhypochlorid und 125mM NaOH

Es wurden 2o µl des mit Citrat versetzten Orbitalvenenblutes mit 2oo µl physiologischer Kochsalzlösung vorverdünnt. Hiervon wurden 2o µl 3o Sekunden mit 1oo µl der Lösung 1 gemischt und 5 Minuten bei 56°C inkubiert. Anschließend wurden je 5oo µl der Lösung 3 und 4 dazugegeben, 3o Sekunden lang gemischt und das Ganze 1o Minuten bei 56°C inkubiert. Nach 1ominütiger Abkühlung wurde bei Filter 546 nm die Extinktion ermittelt.

Die Ausrechnung erfolgte nach der Formel:

Extinktion Probe x Faktor = mg Harnstoff/dl

$$\text{Faktor} = \frac{33}{\text{Ext.Standard}} \quad \text{(bei mg Harnstoff/dl)}$$

Umrechnung auf Harnstoff-N:

Extinktion Probe x Faktor = mg Harnstoff-N/dl

$$\text{Faktor} = \frac{15,4}{\text{Ext.Standard}}$$

ERGEBNISSE

Tabelle 1 zeigt die Konzentration von Lactat, Pyruvat, Alphaketoglutarat, Citrat und Harnstoff im Serum von Ratten nach Binephrektomie bzw. Ureterligatur. Wird die Ketoleucindosis von o,1g/kg/24 h auf 2,og/kg/24 h erhöht, so kommt es 12 und 28 Stunden nach Binephrektomie zu einem signifikanten Abfall der Lactatkonzentration (von 2,53 ± o,14 mmol/ml nach 1,4o ± o,19 mmol/ml und von 2,43 ± o,1o mmol/ml nach 1,95 ± o,16). Dieses Verhalten läßt sich 44 Stunden nach Binephrektomie nur tendenziell nachweisen (2,56 ± o,19 mmol/ml wird zu 2,13 ± o,19 mmol/ml). Bei den ureterligierten Tieren bewirkt die KIC-Dosiserhöhung keine signifikante Veränderung der Lactatkonzentration. Lediglich tendenziell kann man unter der Ketoleucindosis von 2,og/kg/24 h ein leichtes Absinken der insgesamt niedriger erscheinenden Serumlactatkonzentration erkennen (1,52 ± o,22 mmol/ml nach 1,28 ± o,o4 mmol/ml, 1,63 ± o,o8 mmol/ml nach 1,46 ± o,o7 mmol/ml und 1,57 ± o,26 mmol/ml nach 1,19 ± o,27 mmol/ml).

Die Serumpyruvatkonzentration bei binephrektomierten Ratten erfährt durch die Erhöhung der Ketoleucindosis von o,1/g/kg/24 h auf 2,og/kg/24 h nur nach 28 Stunden eine signifikante Erniedrigung. Der Wert fällt hier von 87 ± 11 mmol/ml auf 62 ± 9 mmol/ml. Im 12- und 44-Stunden-Versuch findet sich bei den binephrektomierten Tieren nur andeutungsweise diese Abnahme der Pyruvatkonzentration. Auch bei den ureterligierten Ratten kommt es nach 44 Stunden zu einer angedeuteten Abnahme der Serumpyruvatkonzentration. 12 und 28 Stunden nach Ureterligatur ist dieser Abfall signifikant (von 1o9 ± 25 mmol/ml auf 24 ± 3 mmol/ml von 97 ± 7 mmol/ml auf 7o ± 1o mmol/ml und von 46 ± 3 mmol/ml auf 37 ± 1o mmol/ml).

Mit Erhöhung der Ketoleucindosis von o,1g/kg/24 h auf 2,og/kg/24 h erhöht sich die Alpahketoglutaratkonzentration im Serum bei den binephrektomierten Ratten nach 12 Stunden (von 47 ± 6 mmol/ml auf 112 ± 21 mmol/ml). Bei den ureterligierten Tieren läßt sich dieser Anstieg nach 12 Stunden tendenziell, nach 44 Stunden aber signifikant zeigen. Bei

dieser langen Urämiedauer steigt die Serumalphaketoglutaratkonzentration von 41 ± 5 mmol/ml auf 66 ± 8 mmol/ml an. Die Serumcitratkonzentration wird bei den binephrektomierten Ratten durch die KIC-Dosiserhöhung nicht wesentlich beeinflußt.Ebenso verhält sich dieser Parameter nach Ureterligatur. Nur andeutungsweise läßt sich nach Binephrektomie ein Abfall und nach Ureterligatur ein leichter Anstieg der Citratkonzentration nach Erhöhung der Ketoleucindosis von o,1g/kg/24 h auf 2,og/kg/24 h verzeichnen.

Betrachtet man das Verhältnis von Lactat zu Pyruvat, so zieht die Erhöhung der KIC-Dosis bei den binephrektomierten Ratten nach 12 Stunden eine signifikante Verschiebung der Relation zugunsten von Pyruvat nach sich (von o,o39 ± o,oo4 nach o,o24 ± o,oo4). 28 und 44 Stunden nach Binephrektomie bleibt das Verhältnis Lactat zu Pyruvat annähernd unverändert. Die Ketoleucindosiserhöhung bewirkt bei den ureterligierten Tieren im 12-Stunden-Versuch eine hochsignifikante Verschiedung des Quotienten zugunsten von Lactat. Der Wert steigt hier von o,o18 ± o,oo4 auf o,o61 ± o,oo3. Diese relative Begünstigung von Lactat läßt sich 28 und 44 Stunden nach der Ureterligatur nur tendenziell nachweisen.

Durch die Erhöhung der Ketoleucindosis von o,1/g/kg/24 h auf 2,og/kg/24 h kommt es bei den binephrektomierten Ratten nach 12 Stunden zu einem signifikanten Anstieg des Serumharnstoffes (von 169 ± 8 mmol/ml auf 2o1 ± 6 mmol/ml). Nach längerer Dauer der binephrektomiebedingten Urämie tritt nach 44 Stunden schließlich tendenziell ein Abfall der Serumharnstoffkonzentration auf. Nach Ureterligatur fehlt der anfängliche Anstieg des Serumharnstoffs, es kommt sogar zu einem hochsignifikanten Abfall von 251 ± 9 mmol/ml auf 169 ± 9 mmol/ml. Dieses Absinken läßt sich 28 und 44 Stunden nach Beginn dieser Urämieform nur andeutungsweise nachweisen.

	Lactat nmol/ml	P	Pyruvat nmol/ml	P	α-Keto-glutarat nmol/ml	P	Citrat nmol/ml	P	Lactat:Pyruvat	P	Harnstoff-N mg/100 ml	P
BN 0,1 12	2,53±0,14 n=7		69±8 n=7		47±6 n=6		19±3 n=7		0,039±0,004 n=6		169±8 n=6	
BN 2,0 12	1,40±0,19 n=5	<0,001	66±12 n=5	NS	112±21 n=5	<0,02	15±4 n=5	NS	0,024±0,004 n=5	<0,05	201±6 n=6	<0,02
BN 0,1 28	2,43±0,10 n=6		87±11 n=5		——		——		0,031±0,005 n=5		350±19 n=5	
BN 2,0 28	1,95±0,16 n=6	<0,02	62±9 n=5	<0,05	64±4 n=4		14±4 n=6		0,034±0,006 n=5	NS	349±27 n=6	NS
BN 0,1 44	2,56±0,19 n=6		76±7 n=6		——		——		0,034±0,003 n=6		644±82 n=2	
BN 2,0 44	2,13±0,19 n=5	NS	65±12 n=5	NS	79±8 n=5		62±26 n=5		0,033±0,004 n=4	NS	589±37 n=3	NS
UL 0,1 12	1,52±0,22 n=6		109±25 n=5		73±23 n=5		13±2 n=5		0,018±0,004 n=5		251±9 n=6	
UL 2,0 12	1,28±0,04 n=5	NS	24±3 n=6	<0,02	119±13 n=6	NS	15±4 n=6	NS	0,061±0,003 n=5	<0,005	169±9 n=6	<0,002
UL 0,1 28	1,63±0,08 n=5		97±7 n=4		——		——		0,017±0,002 n=4		364±16 n=5	
UL 2,0 28	1,46±0,07 n=4	NS	70±10 n=4	<0,05	38±11 n=4	NS	25±9 n=4		0,022±0,003 n=4	NS	349±35 n=4	NS
UL 0,1 44	1,57±0,26 n=6		46±3 n=5		41±5 n=4		19±4 n=5		0,034±0,006 n=5		507±75 n=3	
UL 2,0 44	1,19±0,27 n=4	NS	37±10 n=5	NS	66±8 n=5	<0,02	29±10 n=5	NS	0,042±0,003 n=4	NS	506±12 n=4	NS

Tabelle 1: Verhalten von Lactat, Pyruvat, Alpha-Ketoglutarat, Citrat und Harnstoff im Serum von Ratten nach Binephrektomie und Ureterligatur.

In Tabelle 2 und 3 kommen die Protein- und Phosphatkonzentrationen der verschiedenen, nach bilateraler Nephrektomie und Ureterligatur gewonnenen Organe zur Darstellung.

In der Skelettmuskulatur liegen unter Verwendung der höheren Ketoleucin-Dosis (2g/kg/24h) 12 und 28 Stunden nach Binephrektomie der mit o,1g/kg/24 h gefütterten Ratten. Umgekehrt haben wir bei den ureterligierten Tieren 28 und 44 Stunden nach dem operativen Eingriff höhere Proteinkonzentrationen auch nach Gabe der höheren KIC-Dosis gemessen. ($7,37 \pm o,31$ bzw.6,67 ± o,23 mg/ml gegenüber 6,63± o,o2 bzw. 5,79±o,21 mg/ml). Der Leberproteingehalt unterscheidet sich 12 und 44 Stunden nach Binephrektomie oder Ureterligatur bei beiden KIC-Dosierungen nicht voneinander. Lediglich die 28-Stunden-Werte sind unter hochdosierter Ketoleucingabe jeweils niedriger.

12 Stunden nach Binephrektomie ist die Proteinkonzentration im Herzmuskel unter der höheren KIC-Dosis ebenfalls geringer als unter der niedrigeren KIC-Dosierung. Die 28- und 44-Stunden-Werte lassen dagegen keine Unterschiede erkennen. Auch nach Ureterligatur liegt der 12-Stunden-Wert der mit hohen KIC-Dosen gefütterten Tiere unter dem Vergleichwert der Ratten, die nur o,1g Ketoleucin /kg/24h erhalten haben. Hier verhalten sich jedoch die Proteinkonzentrationen nach 28 und 44 Stunden umgekehrt. Die Proteinkonzentrationen der Nieren unterscheidet sich bei beiden verwendeten Ketoleucindosen in allen ureterligierten Gruppen nicht voneinander (Werte zwischen 7,1± o,6 mg/ml und 7,9±o,7 mg/ml).

Der Phosphatgehalt in der Skelettmuskulatur nimmt mit der höheren KIC-Dosis 12 Stunden nach dem operativen Eingriff deutlich zu, nach 28 Stunden aber ebenso deutlich wieder ab, um dann beim 44 Stundenwert sich kaum von den in etwa gleichbleibenden Werten nach Gabe von o,1g/kg/24h zu unterscheiden. In der Leber wird der Phosphatgehalt weder durch die Dauer der Urmäie noch durch KIC-Dosisveränderung wesentlich beeinflußt.

Im Herzmuskel finden sich für die Phosphatkonzentrationen (n Mol/ml Rohextrakt) bei den binephrektomierten Tieren die gleichen Verhältnisse wie in der Leber.

Im Skelettmuskel der ureterligierten Ratten kommt es hinsichtlich des Phosphatgehaltes andeutungsweise wie bei den binephrektomierten Tieren zu einem Anstieg des 12-Stunden-Wertes und einem Abfall nach 28 Stunden nach Gabe der höheren KIC-Dosis. 44 Stunden nach Ureterligatur kommt es aber hier zu einem deutlichen Anstieg des Phosphatgehaltes nach Erhöhung der KIC-Dosis. Vergleicht man den Leberphosphatgehalt der ureterligierten Ratten mit dem der binephrektomierten so liegen unverkennbar ähnliche Verhältnisse vor mit Ausnahme des 28-Stunden-Wertes nach Ureterligatur. Hier kommt es zu einem deutlichen Anstieg des Phosphatgehaltes bei Erhöhung der KIC-Dosis.

Im Herzmuskel blieben die Phosphatgehalte auch bei den ureterligierten Ratten im wesentlichen unverändert. Ebenso unbeeinflußt bleiben die Phosphatgehalte der Nieren bei den ureterligierten Tieren.

Betrachtet man das Verhältnis Phosphat:Protein so ergibt sich bei den binephrektomierten Ratten im Skelettmuskel bei Wahl der höheren KIC-Dosis 12 Stunden und 28 Stunden nach dem operativen Eingriff ein deutlicher Anstieg, der aber im 44-Stunden-Wert nicht nachgewiesen werden konnte, hier ergab die KIC-Dosisänderung keine Verschiebung der Relation.

Bei den ureterligierten Tieren ist das Verhältnis Phosphat: Protein im Skelettmuskel nach 12 Stunden unverändert. 28 Stunden nach der Operation durch die Erhöhung der KIC-Dosis leicht vermindert, nach 44 Stunden ebenfalls unwesentlich beeinflußt.

In der Leber bewirkt die KIC-Dosiserhöhung bei den binephrektomierten Ratten hinsichtlich des Verhältnisses Phophat: Protein im 12- und 28-Stunden-Versuch eine deutliche Ver-

schiebung zugunsten von Phosphat. 44 Stunden nach dem operativen Eingriff ergibt die Erhöhung der Ketoleucindosis keine wesentliche Veränderung der Relation Phosphat:Protein. Bei den ureterligierten Ratten liegen die Verhältnisse ähnlich, nur ist hier der oben genannte Quotient 12 Stunden nach dem operativen Eingriff nicht signifikant verändert.

Protein und Phosphat

Gewebe	Zeit (Std.)	Paramter	Protein (mg/ml)				Phosphat g/ml				Phosphat/Protein g/mg			
		n	KIC o,1	n	KIC 2,o	P	n	KIC o,1	n	KIC 2,o	P	n	KIC o,1	n	KIC 2,o	P
Skelettmuskel	12	24	14,42±o,6o	24	12,72±o,22	<o,o2	24	12,21±o,45	24	14,31±o,36	<o,oo1	24	o,89±o,o5	24	1,13±o,o4	<o,oo1
	28	9	13,76±o,68	13	8,66±o,76	<o,oo1	9	12,15±o,43	13	9,76±o,39	<o,oo1	9	o,93±o,o5	13	1,24±o,11	<o,o25
	44	11	11,8o±o,38	12	11,o2±o,46	NS	12	12,3o±o,41	12	12,14±o,35	NS	12	1,o6±o,o5	12	1,11±o,o4	NS
Leber	12	23	35,98±1,oo	24	34,6 ±1,2	NS	23	1,89±o,18	24	2,4o±o,22	NS	23	o,o6±o,oo5	24	o,o7±o,oo5	<o,o5
	28	1o	35,4o±1,2o	11	28,4 ±1,8	<o,oo5	1o	2,22±o,16	11	2,4o±o,2o	NS	1o	o,o7±o,oo5	11	o,o9±o,o1	<o,o5
	44	11	33,6±o,8	12	34,8± 1,2	NS	12	2,47±o,28	12	2,42±o,24	NS	12	o,o8±o,o1	12	o,o7±o,oo5	NS
Herzmuskel	12	13	14,6±o,66	11	11,92± o,86	<o,o25	13	6,21±o,36	11	6,98±o,35	NS	13	o,43 ±o,o3	11	o,63±o,o7	<o,o2
	28	4	11,72±o,8o	6	14,62 ±2,62	NS	4	6,51±1,39	6	6,o5±o,49	NS	4	o,57±o,13	6	o,48±o,o9	NS
	44	4	12,o2±1,oo	8	13,18±1,o8	NS	4	4,31±o,8o	8	5,2o±o,25	NS	4	o,37±o,o8	8	o,42±o,o4	NS

Tabelle Nr. 2: Verhalten von Protein und Phosphatkonzentration in Skelettmuskulatur, Leber und Herzmuskulatur bei binephrektomierten Ratten.

Protein und Phosphat

Gewebe	Zeit (Std.)	Parameter: Protein mg/ml						Phosphat g/ml						Phosphat/Protein g/mg					
		n	KIC o,1	n	KIC 2,o	P		n	KIC o,1	n	KIC 2,o	P		n	KIC o,1	n	KIC 2,o	P	
Skelettmuskel	12	12	12,38±o,38	12	12,2o±o,18	NS		12	11,97±o,33	12	12,94±o,48	NS		12	o,98±o,o4	12	1,o7±o,o4	NS	
	28	1o	13,26±o,o4	12	14,74±o,62	<o,o5		1o	12,21±o,28	12	1o,93±o,57	NS		1o	o,93±o,o4	12	o,75±o,o4	<o,ooo5	
	44	12	11,58±o,42	12	13,34±o,46	<o,o2		11	8,7o±o,33	12	1o,22±o,4o	<o,o1		11	o,76±o,o3	12	o,76±o,o4	NS	
Leber	12	11	34,o±1,o	12	33,6±1,8	NS		1o	1,93±o,22	1o	1,87±o,22	NS		1o	o,o6±o,o1	1o	o,o6±o,o1	NS	
	28	9	34,4±o,8	12	29,8±2,o	<o,o5		9	1,74±o,28	12	2,65±o,31	<o,o5		9	o,o5±o,o1	12	o,1o±o,o2	<o,o2	
	44	12	34,o±1,4	12	32,2±1,2	<o,o5		12	2,41±o,23	12	2,25±o,24	NS		12	o,o7±o,o1	12	o,o7±o,o1	NS	
Herzmuskel	12	6	13,46±o,76	6	1o,76±o,9o	<o,o5		6	6,23±o,33	6	7,15±o,5o	NS		6	o,48±o,o5	6	o,7o±o,o9	NS	
	28	5	12,14±1,68	5	18,1o±2,22	NS		5	6,48±o,37	6	5,57±o,77	NS		5	o,58±o,o8	6	o,33±o,o5	<o,o5	
	44	4	11,5o±1,32	7	17,5±1,42	<o,o2		4	6,32±o,6o	7	4,75±o,78	NS		4	o,58±o,o8	7	o,3o±o,o6	<o,o2	
Niere	12	12	15,4±1,o	12	15,8±1,4	NS		11	6,o6±o,53	12	5,5o±o,28	NS		11	o,42±o,o5	12	o,39±o,14	NS	
	28	1o	14,2±1,2	12	15,8±1,2	NS		1o	5,48±o,72	12	4,73±o,47	NS		1o	o,44±o,o8	12	o,35±o,o7	NS	
	44	11	15,8±1,o	12	15,8±1,2	NS		11	5,54±o,41	12	4,9o±o,56	NS		11	o,37±o,o4	12	o,35±o,o5	NS	

Tabelle Nr. 3: Verhalten von Protein- und Phosphatkonzentration in Skelettmuskulatur, Leber, Herzmuskulatur und Nieren bei ureterligierten Ratten.

Vergleicht man den Quotienten Phosphat:Protein im Herzmuskel, so findet sich bei den binephrektomierten Ratten nach Erhöhung der KIC-Dosis nur 12 Stunden nach der Operation ein wesentlicher Anstieg des Quotienten. Der 28- und 44-Stunden-Wert zeigen keinen Einfluß der KIC-Dosis auf das Verhältnis Phosphat:Protein. Bei den ureterligierten Ratten haben wir umgekehrte Verhältnisse vor uns: Hier wird der Quotient bei Erhöhung der Ketoleucindosis erheblich niedriger, mit Ausnahme des 12-Stunden-Wertes, bei dem das eben erwähnte Verhältnis unverändert bleibt.

Die Nieren zeigen hinsichtlich des Quotienten Phosphat:Protein keine signifikante Änderung bei KIC-Dosiserhöhung.

In Tabelle 4 und 5 sind die Gesamtkohlenhydrat- und Glykogenkonzentrationen sowie deren Verhältnis zueinander in Skelettmuskel, Leber, Herzmuskel und Nieren nach Binephrektomie bzw. Ureterligatur dargestellt.

Im Skelettmuskel ist der Gesamthohlenhydratgehalt 12 Stunden nach Binephrektomie durch Erhöhung der KIC-Dosis erheblich vermindert. Bei längerer Dauer der so erzielten Urämie hat die Ketoleucingabe keinen signifikanten Einfluß auf den Gesamtkohlenhydratgehalt der Skelettmuskulatur. Nach Ureterligatur zeigt sich im Skelettmuskel nach 12 Stunden wiederum ein Abfall der Gesamtkohlenhydrate durch KIC-Erhöhung. Auch der 28-Stunden-Wert ist bei binephrektomierten und ureterligierten Ratten gleich. 44 Stunden nach Ureterligatur findet sich jedoch ein wesentlicher Abfall des Gesamtkohlenhydratgehaltes im Skelettmuskel bei der 2o-fachen KIC-Dosis.

In der Leber läßt sich durch Änderung der KIC-Dosis 12 und 28 Stunden nach Binephrektomie bzw. Ureterligatur keine signifikante Verschiebung des Gesamtkohlenhydratgehaltes erreichen. Lediglich nach 44 Stunden zeigen die binephrektomierten Ratten nach KIC-Erhöhung einen deutlichen Abfall des Gesamtkohlenhydratspiegels, der bei den ureterligierten Tieren unter denselben Bedingungen nur andeutungsweise vor-

handen ist.

Im Herzmuskel ist der Gesamtkohlenhydratgehalt bei beiden Urämieformen 12 Stunden nach Operation bei KIC-Dosiserhöhung erheblich angestiegen. Nach 28 und 44 Stunden aber finden sich keine signifikant unterschiedlichen Werte. Der Gesamtkohlenhydratgehalt der Nieren erfährt durch Änderung der KIC-Dosis keine signifikanten Unterschiede in den ermittelten Werten.

Hinsichtlich des Glykogengehaltes des Skelettmuskels bewirkt eine Erhöhung der KIC-Dosis 12 Stunden nach Binephrektomie einen erheblichen Anstieg dieses Parameters. Nach 28 Stunden bleiben die Glykogenkonzentrationen ungefähr gleich hoch, sinken jedoch ganz deutlich bei den 44-Stunden-Tieren. Nach Ureterligatur ist der 12-Stunden-Wert durch KIC-Dosiserhöhung ebenso angestiegen. Nur kommt es bei den ureterligierten Ratten schon nach 28 Stunden zu einem noch wesentlicheren Anstieg des Glykogengehaltes. 44 Stunden nach Ureterligatur bewirkt die KIC-Dosiserhöhung in der Skelettmuskulatur keine signifikante Verschiebung des Glykogenspiegels mehr.

In der Leber kommt es durch die KIC-Dosisänderung 12 Stunden nach Binephrektomie zu einer drastischen Verringerung des Glykogengehaltes. Bei längerer Urämiedauer zeigt sich insgesamt ein Anstieg des Leberglykogengehaltes, die Erhöhung der Ketoleucindosis zeigt jedoch keinen meßbaren Einfluß auf die Glykogenkonzentration. Anders verhält es sich nach Ureterligatur: Hier hat die KIC-Dosis nach 12 Stunden noch keinen signifikanten Effekt auf das Leberglykogen. Bei längerer Urämiedauer aber kommt es zu einem deutlichen Absinken des Glykogenspiegels.

Auf den Glykogengehalt des Herzmuskels nach Binephrektomie hat die KIC-Dosis keinen signifikanten Einfluß. Ähnlich verhält es sich bei diesem Organ auch nach Ureterligatur. Nur kommt es hier 12 Stunden nach der Operation vorübergehend zu einem Anstieg des Glykogengehaltes bei der 2o-fachen

KIC-Dosis. Die 28- und 44-Stunden-Werte unterscheiden sich wiederum nicht signifikant, es läßt sich jedoch eine leichte Tendenz zur Abnahme des Glykogengehaltes nach der KIC-Dosiserhöhung feststellen.

Der Glykogengehalt der Nieren nach Ureterligatur und KIC-Dosiserhöhung zeigt nur im 12-Stunden-Versuch eine Erhöhung. Nach 28 und 44 Stunden ist der Glykogengehalt der Nieren zwar insgesamt höher geworden, aber ein signifikanter Einfluß der KIC-Dosiserhöhung läßt sich nicht mehr nachweisen.

Im Skelettmuskel ist der Quotient Glykogen:Gesamtkohlenhydrat 12 Stunden nach beiden Urämieformen um mehr als das doppelte nach Gabe von 2g KIC/kg/24h erhöht. Die binephrektomierten Ratten zeigen jedoch nach 28 Stunden durch die KIC-Dosiserhöhung eine deutliche Verminderung des Quotienten im Skelettmuskel. Das gleiche Phänomen findet sich bei den binephrektomierten Ratten auch nach 44 Stunden. Auch bei den ureterligierten Ratten kommt es durch die Erhöhung der KIC-Dosis 12 Stunden nach dem operativen Eingriff zu einem erheblichen Anstieg des Quotienten Glykogen:Gesamtkohlenhydrat. Nach 28 Stunden ist der KIC-Effekt kaum nachweisbar, bringt aber bei den 44-Stunden-Tieren eine deutliche Verschiebung des Quotienten auf die Seite des Glykogens mit sich.

Der Quotient Glykogen:Gesamtkohlenhydrat erfährt in der Leber bei den binephrektomierten Tieren durch die KIC-Änderung keine signifikante Änderung. Auch bei den ureterligierten Ratten ist bis auf den erhöhten 28-Stunden-Wert keine wesentliche Änderung des Verhältnisses Glykogen:Gesamtkohlenhydrat feststellbar.

Im Herzmuskel erfährt der eben genannte Quotient bei den binephrektomierten Ratten nach 12 Stunden durch die KIC-Erhöhung einen erheblichen Abfall, der dann bei längerer Dauer dieser Urämieform nach 28 Stunden tendenziell und nach 44 Stunden schließlich signifikant höher wird. Bei den ureterligierten Tieren zeigt die KIC-Dosiserhöhung im Herzmus-

kel nach 12 Stunden noch keinen wesentlichen Einfluß. Dann aber findet sich wie bei den binephrektomierten Ratten ein tendenziell ansteigender 12- und 44-Stunden-Wert und ein signifikant vergrößerter 28-Stunden-Wert.

In den Nieren ist der Quotient Glykogen:Gesamtkohlenhydratgehalt 12 Stunden nach Ureterligatur durch die KIC-Dosiserhöhung signifikant angestiegen. Nach 28 bzw. 44 Stunden hingegen ist das Verhältnis Glykogen:Gesamtkohlenhydrat durch die 2o-fache KIC-Dosis signifikant zur Seite der Gesamtkohlenhydrate verschoben.

Gewebe	Zeit (Std.)	Parameter: Gesamtkohlenhydrat g/ml n	KIC ± o,1	n	KIC ± 2,o	P	Glykogen g/ml n	KIC ± o,1	n	KIC ± 2,o	P	Glykogen/Gesamtkohlenhydrat % n	KIC ± o,1	n	KIC ± 2,o	P
		Gesamtkohlenhydrat und Glykogen														
Skelettmuskel	12	24	156±14	23	71±8	< o,oo1	22	2,54±o,31	24	5,4o±o,45	< o,oo1	22	1,74±o,27	23	9,32±1,o5	< o,oo1
	28	8	154±13	13	227±42	NS	8	8,13±o,66	11	6,21±1,43	NS	7	5,39±o,59	11	2,55±o,46	< o,oo5
	44	12	2o7±18	12	2o7±15	NS	12	13,o9 ±2,55	11	5,39±o,49	< o,o2	12	6,4o±1,1o	11	3,16±o,53	< o,o2
Leber	12	23	56±5	22	72±8	NS	23	1,93±o,19	24	1,o6±o,22	< o,oo5	23	3,68±o,34	22	3,13±o,48	NS
	28	1o	132±2o	1o	1o4±11	NS	8	4,3o±o,7o	1o	4,8o±o,91	NS	8	3,92±1,o2	9	5,33±1,11	NS
	44	12	257±24	12	137±12	< o,oo1	1o	29,9o ±2,9o	11	2o,72 ±3,84	NS	1o	1o,74 ±1,84	11	14,o7±1,69	NS
Herzmuskel	12	13	112±17	9	375±1o3	< o,o25	9	6,1o±o,66	11	6,77±o,74	NS	9	6,5o±1,o1	9	3,28±o,59	< o,o2
	28	2	96±14	5	76±13	NS	4	4,28±o,55	5	21,2±1o,o	NS	2	4,9o±2,1o	5	28,63±9,27	< o,o25
	44	4	77±18	6	5o±17	NS	4	5,47±1,22	8	7,58±1,o8	NS	4	7,78±1,73	6	19,19±3,38	< o,o2

Tabelle 4: Verhalten von Gesamtkohlenhydrat- und Glykogenkonzentration in Skelettmuskulatur, Leber und Herzmuskulatur bei binephrektomierten Ratten.

Parameter		Gesamtkohlenhydrat und Glykogen													
Gewebe	Zeit (Std.)	Gesamtkohlenhydrat g/ml					Glykogen g/ml					Glykogen/Gesamtkohlenhydrat %				
		n	KIC 0,1	n	KIC 2,0	P	n	KIC 0,1	n	KIC 2,0	P	n	KIC 0,1	n	KIC 2,0	P
Skelettmuskel	12	9	192±19	12	101±12	<0,001	9	3,30±0,43	8	4,87±0,43	<0,025	8	1,96±0,40	8	4,79±0,81	<0,01
	28	10	116±20	12	141±12	NS	8	5,95±1,35	9	10,42±0,86	<0,02	8	5,45±1,10	9	7,62±1,30	NS
	44	12	218±17	12	95±13	<0,001	4	9,37±1,94	12	9,63±0,89	N	4	4,76±0,14	12	11,26±1,19	<0,001
Leber	12	9	68±8	12	64±4	NS	10	3,0±0,4	12	2,8±0,3	NS	8	5,45±1,47	12	4,48±0,46	NS
	28	7	198±48	12	172±17	NS	9	3,1±0,4	9	15,5±2,7	<0,001	7	1,77±0,37	9	8,42±1,38	<0,001
	44	12	186±25	12	154±14	NS	9	31,6±5,4	11	14,5±1,2	<0,01	9	14,66±1,83	11	10,44±1,64	NS
Herzmuskel	12	5	124±28	5	219±18	<0,025	5	3,87±0,46	6	8,65±1,33	<0,01	4	3,68±0,82	5	4,44±1,05	NS
	28	5	76±19	4	52±18	NS	3	41,32±8,46	4	26,6±2,3	NS	3	7,32±2,81	4	68,03±19,8	<0,05
	44	2	208±125	3	36±5	NS	4	15,13±5,47	7	3,78±0,47	NS	2	5,54±2,53	3	14,21±5,24	NS
Niere	12	11	141±8	12	116±23	NS	12	1,51±0,14	11	1,82±0,29	<0,05	11	1,09±0,10	11	1,78±0,22	<0,01
	28	10	159±31	12	188±17	NS	9	2,44±0,52	11	2,00±0,32	NS	9	1,87±0,34	11	1,09±0,13	<0,05
	44	10	137±15	9	174±19	NS	10	2,43±0,22	11	2,61±0,14	NS	10	1,97±0,24	8	1,38±0,12	<0,05

Tabelle Nr. 5: Verhalten von Gesamtkohlenhydrat- und Glykogenkonzentration in Skelettmuskulatur, Leber, Herzmuskulatur und Nieren bei ureterligierten Ratten.

In Tabelle 6 und 7 kommen die Phosphorylase a sowie die Gesamtaktivität des Enzyms Phosphorylase (a+b-Form) von Skelettmuskel, Leber, Herzmuskel und Nieren nach Binephrektomie bzw. Ureterligatur zur Darstellung. Auch das Verhältnis Phosphorylase a: Phosporylase a+b wird aufgezeigt.

Im Skelettmuskel kommt es bei den binephrektomierten Ratten zu einem starken Anstieg der Phosphorylase a, wenn Ketoleucin in der Konzentration 2,og/kg/die verfüttert wird. Dies betrifft den 12-, 28- und 44-Stunden-Wert. Nach Ureterligatur kann ein nicht ganz so deutlicher Anstieg der Phosphorylase a in der Skelettmuskulatur nur nach 44-stündiger Urämiedauer nachgewiesen werden. Die 12- und die 28-Stunden-Versuche erbringen nur tendenziell einen leichten Anstieg dieses Enzymes bei KIC-Dosis-Erhöhung.

Die spezifische Aktivität der Phosphorylase a in der Leber erweist sich für beide Urämieformen bei KIC-Dosisänderung als nicht signifikant beeinflußbar. Auffallend ist noch eine stetige Abnahme des Enzymgehaltes mit der Dauer der Urämie durch Binephrektomie bzw. Ureterligatur. Ähnlich wie in der Leber verhält sich die Phosphorylase a auch im Herzmuskel. Auch hier kommt es durch die Erhöhung der Ketoleucindosis auf das 2o-fache zu keiner signifikanten Änderung der Enzymaktivität. Dieses Verhalten ist wiederum von der Urämieform unabhängig. Im Gegensatz zur Leber läßt sich aber im Herzmuskel andeutungsweise ein Ansteigen der Phosphorylase-a-Aktivität mit der Dauer der Urämie erkennen. Die Phosphorylase-a-Aktivität der Nieren wird nach Ureterligatur wie auch in Leber und Herz, von der drastischen KIC-Dosiserhöhung auf das 2o-fache nicht signifikant beeinflußt.

Im Skelettmuskel der binephrektomierten Ratten zieht die Erhöhung der Ketoleucindosis auf 2og/kg/die einen deutlichen Anstieg der Gesamtaktivität des Enzyms nach sich. Nach Ureterligatur läßt sich unter den gleichen Versuchsbedingungen hingegen ein Ansteigen des Enzymes nur für den 12-Stunden-Wert verifizieren. Nach 28-stündiger Urämiedauer durch

Ureterligatur erweist sich in der Skelettmuskulatur der Einfluß der KIC-Dosiserhöhung als nicht signifikant und bewirkt schließlich nach 44-stündiger Urämiedauer sogar eine Verminderung der Enzymaktivität.

Die Gesamtphosphorylaseaktität (a+b-Form) bleibt in der Leber der binephrektomierten Tiere durch die Erhöhung der KIC-Dosis auf 2,og/kg/die unbeeinflußt. Nach Ureterligatur liegen die Verhältnisse in der Leber ähnlich. Eine Ausnahme bildet nur der 28-Stunden-Wert. Hier kommt es vorübergehend zu einem Anstieg der spezifischen Aktivität des Enzyms nach Erhöhung der KIC-Dosis.

Im Herzmuskel der binephrektomierten Ratten zeigt die Phosphorylase a+b-Aktivität in Folge der höheren Dosis von Ketoleucin ein bivalentes Verhalten: 12 Stunden nach dem operativen Eingriff ist die Enzymaktivität deutlich erhöht, nach 28 Stunden ist diese Erhöhung der Phosphorylase nur andeutungsweise nachweisbar und weicht schließlich sogar einem Absinken der Enzymaktivität bei den 44-Stunden-Tieren. Ähnliche Verhältnisse sind auch im Herzmuskel der ureterligierten Ratten nachweisbar.

In den Nieren der ureterligierten Tiere bewirkt die Erhöhung der KIC-Dosis auf das 2o-fache nur bei den 28-Stunden-Tieren eine signifikante Erniedrigung der Phosphorylase a+b-Aktivität. 12 und 44 Stunden nach dieser Urämieform ergab die KIC-Änderung keinen wesentlichen Einfluß auf die Enzymaktivität.

Betrachtet man das Verhältnis Phosphorylase a : Phosphorylase a+b, so findet sich in der Skelettmuskulatur der binephrektomierten Ratten mit der höheren Dosis an Ketoleucin 12 Stunden nach dem operativen Eingriff eine geringe, 44 Stunden später aber einen deutlichen Anstieg des Quotienten. Nur auf den 28-Stunden-Versuch hat das Ketoleucin keinen wesentlichen Einfluß. Nach Ureterligatur ist der Quotient im Skelettmuskel im Gegensatz zu den binephrektomierten Tieren im 12-Stunden-Versuch erniedrigt. 28 und

44 Stunden nach Ureterligatur aber ist das Verhältnis der Enzyme zueinander ähnlich wie bei den binephrektomierten Ratten. Auch hier folgt auf einen nicht signifikanten 28-Stunden Unterschied ein deutlicher Anstieg des 44-Stunden-Wertes im Skelettmuskel.

In der Leber erfährt das Verhältnis Phosphorylase a : Phosphorylase a+b unabhängig von der Urämieform in keiner der drei Versuchszeiten durch die KIC-Änderung eine signifikante Verschiebung.

Das gleiche Ergebnis wie in der Leber findet sich auch im Herzmuskel. Auch hier ist der Quotient der Enzyme durch die KIC-Konzentration im wesentlichen unbeeinflußt.

Schließlich ist auch in den Nieren der ureterligierten Tiere das Verhältnis Phosphorylase a : Phosphorylase a+b selbst bei Erhöhung der Ketoleucindosis um das 2o-fache in jeder der drei Urämiezeiten unverändert.

Phosphorylase

Parameter

Gewebe	Zeit (Std.)	Phosphorylase a nmol/1 min/mg Protein						Phosphorylase a+b nmol/1min/mg Protein						Phosporylase a/ a+b %					
		n	KIC	o,1	n	KIC	2,o P	n	KIC	o,1	n	KIC	2,o P	n	KIC	o,1	n	KIC	2,o P
Skelettmuskel	12	24	11o2±82		24	1498±42	<o,oo1	24	1779±71		24	2o49±69	<o,o1	24	o,611±o,o37		24	o,748±o,o32	<o,o1
	28	9	1218±61		13	1913±216	<o,o1	9	19o5±1o4		13	3428±416	<o,oo5	9	o,645±o,o25		13	o,585±o,o41	NS
	44	1o	1o84±121		12	1863±36	<o,oo1	11	1632±68		12	1941±111	<o,o5	1o	o,66o±o,o51		12	o,991±o,o52	<o,oo1
Leber	12	19	191±13		21	176±1o	NS	19	216±11		24	218±13	NS	17	o,898±o,o55		21	o,828±o,o41	NS
	28	9	151± 9		11	14o±1o	NS	1o	228±15		11	196±16	NS	9	o,679±o,o63		11	o,724±o,o33	NS
	44	12	128±11		12	123±13	NS	12	181±18		8	165±15	NS	12	o,735±o,o41		8	o,769±o,o85	NS
Herzmuskel	12	1o	62±16		1o	63±1o	NS	12	223±26		1o	321±29	<o,o2	1o	o,278±o,o63		1o	o,213±o,o42	NS
	28	4	87±26		5	41±13	NS	4	253±82		6	438±38	NS	4	o,482±o,187		5	o,154±o,o44	NS
	44	4	146±33		8	74±12	NS	4	373±41		8	199±1o	<o,oo5	4	o,385±o,o56		8	o,372±o,o56	NS

Tabelle Nr. 6: Verhalten von Phosphorylase a und a+b - Konzentration in Skelettmuskulatur, Leber und Herzmuskulatur bei binephrektomierten Ratten.

Parameter: Phosphorylase

Gewebe	Zeit (Std.)	Phosphorylase a nmol/1min/1mg Protein						Phosphorylase a+b nmol/1min/mg Protein						Phosphorylase a/ a+b %					
		n	KIC o,1	n	KIC 2,o	P		n	KIC o,1	n	KIC 2,o	P		n	KIC o,1	n	KIC 2,o	P	
Skelettmuskel	12	12	1o92±79	9	1255±68	NS		12	1581±1o4	12	2o69±113	<o,oo5		12	o,7o1±o,o42	9	o,579±o,o38	<o,o5	
	28	1o	1o28±74	12	1o65±73	NS		9	1794±127	12	2127±1o5	NS		9	o,59o±o,o48	12	o,499±o,o22	NS	
	44	11	1128±87	12	1426±76	<o,o2		12	2o67±112	12	1685±82	<o,o2		11	o,567±o,o54	12	o,851±o,o33	<o,oo1	
Leber	12	8	2o5±25	11	198±23	NS		1o	253±16	11	261±18	NS		8	o,777±o,o62	11	o,747±o,o59	NS	
	28	9	135±1o	12	144±1o	NS		9	168±14	12	214±16	<o,o5		9	o,824±o,o59	12	o,689±o,o36	NS	
	44	12	125±7	12	111±8	NS		8	166±6	8	149±13	NS		8	o,824±o,o28	8	o,73o±o,o7o	NS	
Herzmuskel	12	1o	62±16	1o	63±1o	NS		12	223±26	1o	321±29	<o,o2		1o	o,278±o,o63	1o	o,213±o,o42	NS	
	28	4	87±26	5	41±13	NS		4	253±82	6	438±38	NS		4	o,488±o,187	5	o,154±o,o44	NS	
	44	4	164±33	8	74±12	NS		4	373±41	8	199±1o	<o,oo5		4	o,385±o,o56	8	o,372±o,o56	NS	
Niere	12	5	111±2o	9	161±32	NS		11	141±21	9	194±52	NS		5	o,662±o,113	5	o,545±o,o65	NS	
	28	5	81±14	5	98±28	NS		6	28o±29	1o	163±25	<o,o1		4	o,315±o,o76	5	o,521±o,146	NS	
	44	5	6o±16	1o	91±18	NS		11	166±19	7	174±3o	NS		5	o,377±o,o77	5	o,363±o,o36	NS	

Tabelle 7: Verhalten von Phosphorylase a und a+b-Konzentration in Skelettmuskulatur, Leber, Herzmuskulatur und Nieren bei ureterligierten Ratten.

Tabelle 8 und 9 beschreiben die Aktivitäten der Glykogensynthese I- und D+I-Form in Skelettmuskel, Leber, Herzmuskel und Nieren nach Binephrektomie bzw. Ureterligatur. Auch das Verhältnis der beiden Enzymformen zueinander wird berücksichtigt.

Wenn den Versuchstieren 2,og/kg/die an Ketoleucin verfüttert wird, so steigt in der Skelettmuskulatur die aktive I-Form der Glykogensynthestase 28 Stunden nach Binephrektomie deutlich an. 12 bzw. 44 Stunden nach Binephrektomie läßt sich ein Anstieg dieses Enzyms durch die höhere KIC-Dosis nur andeutungsweise erkennen. Die Werte liegen hierbei an der Grenze der Signifikanz. Werden den Versuchstieren aber die Ureteren unterbunden, so ist die I-Form der Glykogensynthese nur im 28-Stunden-Versuch im Skelettmuskel deutlich erhöht. 44 Stunden nach Ureterligatur ist hier die Enzymaktivität durch die KIC-Dosiserhöhung erniedrigt.

In der Leber der binephrektomierten Ratten bewirkt die Erhöhung der KIC-Dosis von o,1g/kg/die auf 2,og/kg/die lediglich 28 Stunden nach dem operativen Eingriff einen signifikanten Anstieg der aktiven I-Form der Glykogensynthese. Die 12- und 44-Stunden-Werte zeigen nur tendenziell diesen Effekt. Werden die Ratten ureterligiert, so sind in der Leber die Aktivitäten der Glykogensynthetase I vergleichbar. Auch hier ist nur der 28-Stunden-Versuch von eindeutiger Signifikanz. Die 12- und 44-Stunden-Werte zeigen wie bei den nephrektomierten Ratten nur tendenziell ein Ansteigen der Enzymaktivität unter der höheren KIC-Dosis.

Im Herzmuskel der binephrektomierten Tiere bewirkt die Erhöhung der KIC-Dosis auf das 2o-fache lediglich 44 Stunden nach dem operativen Eingriff eine signifikante Erniedrigung der Glykogensynthetase-I-Aktivität. Bei 12- und 28-stündiger Urämiedauer ist eher tendenziell ein Abfallen der Enzymaktivität nachweisbar. Nach Ureterligatur ist dieser Abfall der Glykogensynthetase-I-Aktivität im 28- und 44-Stunden-Versuch ebenfalls nachweisbar. Nur kommt es 12 Stunden nach Ureterligatur im Herzmuskel der Versuchstiere bei Erhöhung

der Ketoleucindosis vorübergehend andeutungsweise zu einem Anstieg der Glykogensynthetase-I. In den Nieren der ureterligierten Ratten läßt sich durch Änderung der KIC-Dosis keine wesentliche Beeinflussung der Glykogensynthetase-I-Aktivität erzielen. Das gilt für den 12-, 28- und 44-Stunden-Wert. Die I+D-Form der Glykogensynthetase kann im Skelettmuskel der binephrektomierten Tiere nach Gabe der höheren Dosis an Ketoleucin im 28-Stunden-Versuch als signifikant vermehrt angesehen werden. Nach 12- bzw. 44-stündiger Dauer dieser Urämieform ist dieser Anstieg nur tendenziell nachweisbar. Auch bei den ureterligierten Ratten ist nach 12 und 28 Stunden die Glykogensynthetase I+D nach vermehrter KIC-Gabe signifikant erhöht. Eine Ausnahme bildet der 44-Stunden-Wert, er ist durch die Wahl der höheren KIC-Dosis sogar erniedrigt. Vergleicht man das Verhältnis Glykogensynthetase I : Glykogensynthetase I+D in der Skelettmuskulatur so ergibt sich unabhängig von der Urämieform keine signifikante Verschiebung der Relation nach Gabe der höheren Ketoleucindosis. Der Quotient ändert sich auch nicht bezüglich der unterschiedlichen Urämiezeiten.

In der Leber der binephrektomierten Ratten kommt es unter Gabe von 2,0g/kg/die Ketoleucin nur tendenziell zu einem Anstieg der Glykogensynthetase I+D. Auch nach Ureterligatur läßt sich ein tendenzieller Anstieg der Glykogensynthetase I+D in der Leber nach Ablauf von 12 und 44 Stunden erkennen. Nach Gabe der höheren KIC-Dosis kommt es aber zu einem signifikanten Anstieg des Enzymes bei den 28-Stunden-Versuchen.

Das Verhältnis der Glykogensynthetase I zur Glykogensynthetase I+D in der Leber wird 12 und 44 Stunden nach Binephrektomie durch die KIC-Dosisänderung nicht wesentlich beeinflußt. Anders ist es mit dem 28-Stunden-Wert. Hier kommt es zu einer deutlichen Verschiebung zugunsten der Glykogensynthetase I. Bei den ureterligierten Ratten erweist sich der Quotient Glykogensynthetase I : Glykogensynthetase I+D nicht signifikant durch Ketoleucin verändert.

Die Glykogensynthetase I+D im Herzmuskel der binephrektomierten Versuchstiere wird durch die Erhöhung der KIC-Dosis auf das 2o-fache nicht signifikant verändert. Es läßt sich lediglich tendenziell nach 12 und 28 Stunden ein Anstieg erkennen, der aber nach 44 Stunden von einem Abfall der Enzymaktivität abgelöst wird. Im Herzmuskel der ureterligierten Tiere findet sich ebenfalls kein signifikanter Einfluß der KIC-Dosissteigerung auf die Glykogensynthetase (I+D-Aktivität). Auch hier läßt sich wieder tendenziell ein Anstieg des 12-Stunden-Wertes und ein Abfall des 28- und 44 Stunden-Wertes erkennen. Betrachtet man das Verhältnis der Glykogensynthetase I zur Glykogensynthetase I+D im Herzmuskel, so sieht man, daß die Ketoleucindosierung von 2,og/kg/die das Verhältnis der beiden Enzyme bei den binephrektomierten Ratten nur im 44-Stunden-Versuch zugunsten der I+D-Form verändert. Ansonsten erscheint die Relation der beiden Enzymformen nach 12 und 28 Stunden von der KIC-Dosis unbeeinflußt. Auch nach Ureterligatur wird der Quotient I/I+D im Herzmuskel einmal, in diesem Fall schon nach 28 Stunden auf die Seite der I+D-Form verschoben. Tendenziell läßt sich eine derartige Verschiebung auch im 44-Stunden-Versuch durch die Erhöhung der Ketoleucindosis nachweisen.

Der 12-Stunden-Wert bleibt im Herzmuskel auch nach Gabe von 2,og/kg/die Ketoleucin bei den ureterligierten Ratten unverändert. In den Nieren der ureterligierten Tiere bewirkt die Erhöhung der KIC-Dosis von o,1g/kg/die auf 2,og/kg/die nach 12 und 28 Stunden noch keine wesentliche Änderung der Glykogensynthetase I+D-Aktivität. Erst nach 44 Stunden ist ein signifikanter Anstieg der Glykogensynthetase I+D nachweisbar.

In den Nieren der ureterligierten Ratten läßt sich ein bivalentes Verhalten des Quotienten Glykogensynthetase I : Glykogensynthetase I+D erkennen. 28 Stunden nach der so induzierten Urämie ist das Verhältnis I/I+D zugunsten der I-Form verschoben. Nach 44 Stunden aber wird eindeutig die I+D-Form begünstigt. Der 12-Stunden-Wert läßt dahingehend keinen signifikanten Einfluß der KIC-Dosisänderung auf das Verhältnis I:I+D in den Nieren erkennen.

Glykogensynthetase

Gewebe	Zeit (Std.)	Glykogensynthetase Form I nmol/1min/ml RE n	KIC o,1	n	KIC 2,o	P	Glykogensynthetase Form I+D nmol/1min/ml/RE n	KIC o,1	n	KIC 2,o	P	Glykogensynthetase I/I+D % n	KIC o,1	n	KIC 2,o	P
Skelettmuskel	12	23	32,3±3,2	23	36,4±2,8	NS	23	32,8±3,3	24	38,4±3,2	NS	23	o,992±o,o13	23	o,965±o,o28	NS
	28	8	34,7±2,8	13	63,2±7,5	<o,oo5	8	34,8±3,2	13	65,1±8,1	<o,oo5	8	1,oo5±o,o15	13	o,978±o,o19	NS
	44	12	4o,3±2,4	11	43,o±2,8	NS	12	41,3±2,7	12	43,7±2,5	NS	12	o,981±o,o18	11	o,996±o,o26	NS
Leber	12	23	o,84±o,12	24	1,o4±o,17	NS	22	1,42±o,2o	24	1,65±o,27	NS	23	o,672±o,o54	24	o,68o±o,o37	NS
	28	9	o,44±o,o5	11	o,97±o,14	<o,oo5	8	o,8o±o,o8	11	1,o9±o,13	NS	8	o,579±o,o27	11	o,886±o,o48	<o,oo1
	44	12	o,59±o,o9	8	o,58±o,12	NS	12	o,97±o,18	12	1,35±o,22	NS	12	o,697±o,o53	8	o,568±o,o92	NS
Herzmuskel	12	13	11,2±2,5	11	16,o±3,8	NS	13	26,7±3,3	11	31,8±17,1	NS	13	o,39o±o,o69	11	o,514±o,o8o	NS
	28	3	8,4±3,8	6	16,6±2,9	NS	4	15,6±7,2	6	23,7± 3,3	NS	3	o,849±o,113	6	o,71o±o,o67	NS
	44	4	35,o±2,6	8	11,o±3,1	<o,oo1	4	46,9±4,8	8	31,8±6,5	NS	4	o,765±o,o8o	8	o,35o±o,o6o	<o,oo5

Parameter

Tabelle 8: Verhalten der Glykogensynthetasekonzentration in Skelettmuskulatur, Leber und Herzmuskulatur bei binephrektomierten Ratten.

Glykogensynthetase

Gewebe	Parameter: Zeit (Std.)	Glykogensynthetase I-Form nmol/1min/ml/RE n	KIC o,1	n	KIC 2,o	P	Glykogensynthetase I+D-Form nmol/1min/ml RE n	KIC o,1	n	KIC 2,o	P	Glykogensynthetase I/I+D n	KIC o,1	n	KIC 2,o	P
Skelettmuskel	12	11	22,2±3,6	11	29,6±3,3	NS	12	23,o±4,1	1o	35,9±3,2	<o,o25	11	o,95o±o,o54	8	o,934±o,o47	NS
	28	9	27,2±3,9	12	37,8±2,4	<o,o5	9	28,6±4,3	12	39,1±2,5	<o,o5	9	o,962±o,o16	12	o,976±o,o28	NS
	44	11	53,7±4,1	12	24,9±2,2	<o,oo1	11	56,8±3,3	12	24,4±2,2	<o,oo1	1o	o,983±o,o11	12	1,o27±o,o32	NS
Leber	12	9	1,33±o,15	9	1,88±o,25	NS	11	2,82±o,39	11	3,5±o,5	NS	9	o,538±o,o48	9	o,567±o,o8o	NS
	28	9	o,36±o,o6	1o	o,94±o,23	<o,o5	9	o,64±o,1o	11	1,48±o,29	<o,o2	9	o,6o4±o,o61	9	o,765±o,o9o	NS
	44	12	o,65±o,o6	11	o,76±o,17	NS	12	o,87±o,11	1o	1,24±o,26	NS	12	o,783±o,o37	1o	o,633±o,o8o	NS
Herzmuskel	12	6	18,7±2,5	6	25,6±4,3	NS	6	34,3±3,5	6	38,1±5,4	NS	6	o,565±o,o88	6	o,672±o,o64	NS
	28	5	25,9±1o,5	6	7,2±2,7	NS	5	29,o±11,6	6	11,5±4,4	NS	5	o,883±o,o12	6	o,619±o,o59	<o,oo5
	44	4	11,8±4,5	7	6,4±1,9	NS	4	21,1±8,1	7	17,1±5,8	NS	4	o,586±o,o67	7	o,441±o,o82	NS
Niere	12	12	o,32±o,o3	11	o,33±o,o3	NS	1o	o,43±o,o3	11	o,41±o,o6	NS	1o	o,71o±o,o63	1o	o,891±o,o65	NS
	28	8	o,35±o,o4	7	o,43±o,o6	NS	8	o,51±o,11	1o	o,42±o,o5	NS	6	o,679±o,o92	6	1,o83±o,114	<o,o2
	44	1o	o,39±o,o2	12	o,39±o,o4	NS	1o	o,52±o,o6	11	o,71±o,o4	<o,o2	9	o,8oo±o,1o6	11	o,543±o,o5o	<o,o5

Tabelle Nr. 9: Verhalten der Glykogensynthetasekonzentration in Skelettmuskulatur, Leber, Herzmuskulatur und Nieren bei ureterligierten Ratten.

DISKUSSION

Unter einer Dosierung von o,1 und 2,o g Ketoleucin pro kg Körpergewicht pro Tag war die Überlebensrate bei binephrektomierten und ureterligierten Ratten bis zur 44. Stunde 1oo%. Eine 1oo%ige Letalität 45 Stunden nach Binephrektomie unter höherer Ketoleucindosierung ist von Hörl et al. (8) mitgeteilt. Die Transaminierung von Ketoleucin zu Leucin geschieht in Abhängigkeit von der Alpha-Ketoglutaratkonzentration. Alpha-Ketoglutarat ist ein bevorzugtes Substrat für die Glukoneogenese der Niere (3o,31). Nach Binephrektomie könnte ein Anstieg der Plasma-alpha-Ketoglutaratkonzentration die Umwandlung von Ketoleucin zu Leucin inhibieren. Unsere Versuche zeigen jedoch nach Binephrektomie sowohl unter höherer als auch unter niedrigerer Ketoleucindosierung zumindest 12 und 44 Stunden nach dem Eingriff keine sichere Differenz zu den ureterligierten Ratten (vgl. Tabelle 1).

Die Harnstoff-N-Werte liegen nach Binephrektomie und Ureterligatur nach 12 und 28 Stunden in vergleichbarer Größenordnung. Niedriger sind die Harnstoff-N-Konzentrationen nach 44-stündiger Versuchsdauer unter niedriger und hochdosierter Ketoleucinverfütterung bei ureterligierten Ratten im Vergleich zu den binephrektomierten Tieren. Während unter niedriger Ketoleucindosierung 12 Stunden nach Binephrektomie der Harnstoff-N-Wert auch erwartungsgemäß niedriger liegt, sind die Vergleichszahlen nach Ureterligatur gerade umgekehrt. Die Harnstoff-N-Werte liegen jedoch unter Ketoleucinverfütterung deutlich unter den Vergleichswerten einer Leucinverfütterung.

Im Skelettmuskel, der Leber und des Herzmuskels führt die hochdosierte Ketoleucinverfütterung zu keinem zusätzlichen proteinanabolen Effekt im Vergleich zu der niedrigeren Ketoleucindosierung. Dabei unterscheiden sich die Effekte der ureterligierten Tiere nicht wesentlich von den binephrektomierten Vergleichsratten. Die verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin werden in der Leber transaminiert, jedoch extrahepatisch oxydiert (32,1o,33,34). Im perfundier-

ten Herzmuskel führt die Applikation von verzweigtkettigen Aminosäuren zu einem Anstieg der Proteinsynthese (35). Chavela et al. (36,37) konnten zeigen, daß durch die Applikation von alpha-Ketoisovaleriat (Ketovalin) die Umwandlung des Ketoanalogen in die entsprechende Aminosäure mit zunehmender Konzentration abnimmt. So war die Effizienz der Utilisierung des Alpha-Ketoanalogen etwa 8o% in niedriger Dosierung und unter 4o% in hoher Dosierung. Offensichtlich ist mit niedriger Ketoleucindosierung (o,1g/kg/Tag) bereits die maximale Utilisierung erreicht bzw. überschritten, so daß die 1o-fache Erhöhung der Ketoleucinapplikation zu keinem weiteren proteinanabolen Effekt führt (vergleiche Tabelle 2 und Tabelle 3).

Die Applikationen hoher und niedriger Ketoleucindosen beeinflußt unter Ureterligatur und Binephrektomie kaum den Gesamtkohlenhydratgehalt in den einzelnen untersuchten Gruppen. Dagegen kommt es nach Ureterligatur überwiegend zu einem prozentualen Anstieg des Glykogengehaltes unter hochdosierter Ketoleucingabe in den einzelnen Organen. Dieser Effekt ist insofern bemerkenswert, als Ketoleucin bzw. Leucin keine glukoplastische Ketosäure bzw. Aminosäure darstellt.

Deutlich wird diese Tatsache dadurch, daß Ketoleucin sowohl in hoher als auch in niedriger Dosierung bei ureterligierten und binephrektomierten Ratten die Glykogensynthetase wie auch das glykogenabbauende Enzym Phosphorylase kaum signifikant beeinflußt.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei Erhöhung der Ketoleucindosis von o,1 g/kg/24h auf 2,o g/kg/24h ändern sich die untersuchten Parameter wie folgt:

12 und 28 Stunden nach Binephrektomie sinkt der Serumlactatspiegel deutlich, nach 44 Stunden nur tendenziell. Bei den ureterligierten Tieren läßt sich dieser Abfall nur andeutungsweise erkennen. Auch die Pyruvatkonzentration im Serum fällt bei beiden Urämieformen teils klar, teils nur tendenziell ab. Dieses Verhalten ist bei beiden Urämiegruppen nach jeweils 28 Stunden signifikant. Die Alphaketoglutaratkonzentration im Serum steigt im Binephrektomieversuch gleich zu Beginn deutlich an. Nach Ureterligatur tritt dieser Effekt erst nach 44-stündiger Urämiedauer eindeutig auf. Hinsichtlich der Serumcitratkonzentration lassen sich bei beiden Urämieformen keine signifikanten Unterschiede erkennen. Der Quotient Lactat zu Pyruvat wird bei den binephrektomierten Tieren nach 12 Stunden signifikant zugunsten von Pyruvat verschoben. Nach Ureterligatur tritt eine wesentliche Verschiebung ebenfalls schon nach 12 Stunden ein, hier aber zugunsten von Lactat. Hinsichtlich der Harnstoffkonzentration im Serum treten eindeutige Änderungen wiederum nur im 12-Stunden-Versuch auf. Bei den binephrektomierten Tieren ist hierbei ein deutlicher Anstieg, bei den ureterligierten Ratten dahingegen ein ebenso deutlicher Abfall nachweisbar. Bei beiden Urämieformen steigt mit der Urämiedauer auch der Serumharnstoff insgesamt gesehen an.

Bei den binephrektomierten Ratten findet sich eine deutliche Erniedrigung des Proteingehaltes der Skelettmuskulatur, die tendenziell auch in Leber und Herzmuskel nachweisbar ist. Der Quotient Phosphat/Protein zeigt überwiegend einen Anstieg in Leber und Skelettmuskel, der aber auch im Herzmuskel andeutungsweise vorhanden ist. Bei den ureterligierten Ratten steigt der Proteingehalt im Skelettmuskel tendenziell an, sinkt aber in der Leber eher ab. Im Herzmuskel läßt sich nach vorübergehendem Absinken des Proteingehalts ein ausgeprägter Anstieg verzeichnen. Die Proteinkonzentra-

tion der Nieren bleibt unverändert. Der Quotient Phosphat/Protein wird in der Skelettmuskulatur andeutungsweise zugunsten von Protein verschoben, in der Leber aber zugunsten von Phosphat. Im Herzmuskel kommt es zu einem Absinken des Quotienten.

Nach Binephrektomie bleibt der Gesamtkohlenhydratspiegel der Skelettmuskulatur etwa gleich hoch. Die Leberwerte sind nur bei den zuletzt getöteten Tieren deutlich erniedrigt. Im Herzmuskel findet sich nur zu Beginn ein deutlicher Anstieg der Gesamtkohlenhydratkonzentration. Der Glykogengehalt der Skelettmuskulatur ist nur nach 12 Stunden deutlich erhöht, sonst aber ebenso deutlich erniedrigt.

Der Glykogengehalt der Leber tendiert leicht zum Abfall. Der Glykogengehalt der Herzmuskulatur wird nicht wesentlich beeinflußt. Der Quotient Glykogen/Gesamtkohlenhydrat ist im Skelettmuskel nach vorübergehender Erhöhung deutlich erniedrigt. In der Leber findet sich kein Unterschied. Im Herzmuskel ist der Quotient nach vorübergehender Erniedrigung deutlich erhöht.

Nach Ureterligatur fällt der Gesamtkohlenhydratgehalt der Skelettmuskulatur signifikant ab. Im Herzmuskel kommt es nur anfangs zu einem Anstieg bei ansonsten in etwa gleichbleibenden Werten. Leber und Niere zeigen keine wesentlichen Unterschiede im Gesamtkohlenhydratgehalt. Im Skelettmuskel zeigt die Glykogenkonzentration eine deutliche Tendenz zum Anstieg. Die Leber zeigt nach vorübergehendem Anstieg ein deutliches Absinken der Glykogenkonzentration. Im Herzmuskel findet sich nur anfangs ein Anstieg der Glykogenkonzentration, der dann aber von tendenziell leicht fallenden Werten abgelöst wird. In den Nieren ist der Glykogengehalt nur nach 12 Stunden erhöht, ansonsten aber etwa gleichbleibend. Der Quotient Glykogen/Gesamtkohlenhydrat verhält sich im Skelettmuskel ansteigend, in der Leber nach vorübergehendem Anstieg hingegen abfallend. Im Herzmuskel zeigt der Quotient eine leichte Tendenz zum Anstieg. In den Nieren kommt es nach anfänglichem Größerwerden zum Kleinerwerden des Quo-

tienten. Nach Binephrektomie steigt die Phosphorylase a lediglich im Skelettmuskel deutlich an, in Leber und Herzmuskel bleiben die Konzentrationen annähernd gleich. Die Phosphorylase a+b ist im Skelettmuskel angestiegen. Im Herzmuskel kommt es überwiegend zu dessen Absinken. Der Quotient a/a+b hat im Skelettmuskel steigende Tendenz, ist in Leber und Herzmuskel aber annähernd unverändert.

Nach Ureterligatur tendiert die Phosphorylase a im Skelettmuskel zum Ansteigen. Bei den übrigen Organen resultieren keine wesentlichen Konzentrationsunterschiede. Die Phosphorylase a+b der Skelettmuskulatur steigt anfangs deutlich an, sinkt aber nach 44 Stunden ebenso stark ab. In der Leber verhält sich die a+b-Form tendenziell ansteigend. Im Herzmuskel ist das Enzym anfangs deutlich erhöht, fällt später aber ebenso deutlich wieder ab. In der Niere erweist sich das Enzym tendenziell fallend. Der Quotient a/a+b fällt bei den zuerst getöteten Tieren im Skelettmuskel ab, steigt aber nach 44 Stunden wieder an. In den übrigen Organen ist der Quotient annähernd unverändert.

Nach Binephrektomie tendiert die Glykogensynthetase im Skelettmuskel in beiden Formen zu einer Erhöhung. Ein ähnliches Verhalten zeigt sich in der Leber. Im Herzmuskel ist die I-Form bei den zuletzt getöteten Tieren deutlich erniedrigt. Der Quotient I/I+D ist im Skelettmuskel nicht signifikant unterschiedlich. In der Leber erscheint er unverändert bis leicht erhöht. Im Herzmuskel kommt es nach 44 Stunden zu einem Absinken des Quotienten.

Nach Ureterligatur findet sich im Skelettmuskel bei der I und I+D-Form nach einem vorübergehenden Anstieg ein deutlicher Abfall. In der Leber läßt sich für beide Enzymformen eine Tendenz zum Anstieg nachweisen. Im Herzmuskel kommt es zu keiner wesentlichen Änderung der Enzymkonzentrationen. Ebenso verhält es sich in den Nieren. Der Quotient I/I+D zeigt in Muskel und Leber keine wesentlichen Veränderungen. Im Herzmuskel erscheint nur andeutungsweise ein Abfall des Quotienten. In den Nieren hingegen sinkt der Quotient nach anfänglicher Erhöhung.

LITERATURVERZEICNIS

1. Piorry und L'Hêritier: Traite des alter ationes du sang, Kap. 12, Paris, 184o

2. Mc.Murry, St.D.: Luft,F.C., Maxwell,D.R, Hamburger,R.J.,Futty,D. Szwed, J.J.,Lavelle,K.J. Kleit, St.A. Department of Medicine, Nephrology Section and Department of Medical Genetics, Indiana University School of Medicine, Indianapolis USA, Arch.Intern.Med 138, 95o-955 (1978)

3. Abel, R.M.: Beck,C.J.,Winetal,A. Improved survival form acute renal failure after treatment intravenous essential L-amino acids and glucoses N.Eng.J.Med. 288: 695-699, 1973

4. C.Giordano: Desanto, N.G., Senatore, R. Effects of catabolic stress in acute und chronic renal failure. Am.J.Clin.Nutr. 31 : 1561 (1978)

5. Sarre, H.: Nierenkrankheiten Thieme-Verlag (1976)

6. Shear, L.: Internal redistributation of tissue protein synthesis in uremia. J.Clin.Invest 48:1252 (1969)

7. McCormick, G.J.: Shear,L., Barry,K.G. Alter ation of hepatic protein synthesis in acute uremia. Proc.Soc.Ex.Biol.Med. 122:99 (1966)

8. Hörl, W.H.: Kittel,R.,Heidland,A. Effects of high doses of leucine and ketoleucine on glycogen and protein metabolism in acute uremia. Am.J.Clin.Nutr. 33:1468-1475 (198o)

9. Buse, M.G.,Reid, S.S.: Leucine: a possible regulator of protein turnover in muscle. J.Clin.Invest.56:125o (1975)

1o. Dawson, A.G.,Hird,J.R.: Morton, D.J. Oxidation of leucine by rat liver and kidney. Arch.Biochem.Biophys. 122:426 (1967)

11. Odessey, R.: Goldberg, A.C. Oxidation of leucine by rat muscle. Am.J.Physiol. 223:1376 (1972)

12. Buse, M.G., Reid, S.S.: Leucine: A possible regulator of protein turnover in muscle. J.Clin.Invest. 56:125o (1975)

13. Sherwin, R.S.: Effect of starvation on turnover and metabolic response to leucine. J.Clin.Invest. 61:1471 (1978)

14. Sherwin, R.S.,Felig,P.: Glucose and nitrogen sparing effects of exogenous leucine and decreased endogenous leucine in starvation. Clin.Res. 25:4oo (1977)

15. Adibi, S.A.: Peterson, J.A., Kryszik, B.A. Modulation of leucine transaminase activity by dietary means. Am. J.Physiol. 228:432 (1975)

16. Lundholm, K.: Schersten, T. Protein synthesis in human skeletal muscle tissue: influence of insulin and aminoacids. European J.Clin.Invest. 7:531 (1972

17. Butcher, R.W.:
Robinson, G.A.
Sutherland, E.W.
Biochemical actions of hormones.
Edited by Gerald Litwack
Volume II
Academic Press New York and London
(1972)

18. Kemp,B.E., Clark, M.G.: Adrenergic control of the cyclic-AMP dependet protein kinase and pyruvatkinase in solated hepatocytes.
J.Biol.Chem. 253:5147 (1978)

19. Hörl,W.H., Heidland,A.: Enhanced proteolytic activity: cause of protein catabolism in acute renal failure.
Am. J.Clin.Nutr. 33:1423 (198o)

2o. Hörl,W.H., Heidland,A.: Glycogen metabolism in muscle in uremia.
Am.J.Clin.Nutr. 33:1461 (198o)

21. Hörl, W.H.,Stepinski,J.:
Schäfer, R.,Schlenk,G.
Heidland, A.
Über die Schlüsselrolle von Serin im Kohlenhydratstoffwechsel bei akuter Urämie.
In: Dittrich Pr (Herausgeber)
Aktuelle Probleme der Dialyse
Bindernagel, Friedberg (in press)

22. Stumpf,B., Kraus, H.:
Kasten, R.
The influence of branched chain amino acids and their ketoderivates on renal gluconeogensis.
In: Hans Huber (Herausgeber)
Renal metabolism in relation to renal function.
Bern,Stuttgart,Wien, p.51 (1976)

23. Bergmeyer, H.: Methoden der enzymatischen Analyse S.1491-1541 (Verlag Chemie, Weinheim, 1974)

24. Montgomery, R.: Determination of glycogen. Arch.Biochem.Biophys. 67:378 (1957)

25. Lowry,O.H.: Rosebrough, N.J. Farr,A.L.,Randall,R.J. Protein measurements with folin reagent. J.Biol.Chem. 193:265 (1951)

26. Fiske, C.H.,Cyrus, H.: Subarrow, Yellapragada The colorimetric determination of Phosphorus. J.Biol.Chem. 66:375 (1925)

27. Hedrick, J.L.: Fischer, E.H. On the role of pyridoxol 5'-phosphate in phosphorylase I. Absence of classical vitamin B_6-dependent enzymatic in muscle glycogen phosphorylase. Biochemistry 4:1337 (1965)

28. Stalmans, W.,Hers,H.G.: The stimulation of liver phosphorylase b by AMP, fluoride and sulfate. European J.Biochem. 54:341 (1975)

29. Thomas, J.A.: Schlender, K.K., Larner,J. A rapid filter paper assay for UDP glucose-glycogen glycosyltransferase including an improved biosynthesis of UDP-^{14} C-glucose. Anal.Biochem. 25:486 (1968)

3o. Cohen, J.J.,Wittmann,E.: Renal utilization and excretion of α-Ketoglutarate in dog: effect of alkalosis. Am.J.Physiol. 2o4:795 (1963

31. Pashley,D.H.,Cohen,J.J.: Substrate interconversion in dog kidney cortex slices: regulation by ECF-pH.
Am.J.Physiol. 225:1519 (1973)

32. Miller, L.L.: The role of the liver and non hepatic tissues in the regulation of free amino acid levels in blood.
In: Amino acid pools (J.T. Holden, ed.).
Elsevier Publishing Co., Amsterdam
p. 7o8 (1962)

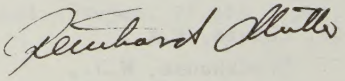
33. Goldberg, H.M.:
Odessey, R. Oxidation of amino acids by diaphragms from fed and fasted rats.
Am.J.Physiol. 223:1384 (1972)

34. Goodman, H.M.: Stimulatory action of insulin on leucine uptake and metabolism in adipose tissue.
Am.J.Physiol. 2o6:129 (1964)

35. Rannels, E.D.:
Hjalmarson, A.C.,
Morgan, H.E. Effects of noncarbohydrate substrates on protein synthesis in muscle.
Am.J.Physiol. 226:528 (1974)

36. Chawla, R.K.:
Rudman, D.: Utilization of α-keto and α-hydroxy analogues of valine by the growing rat.
Am.J.Clin. Invest. 54:271 (1974)

37. Chawla, R.K.:
Stackhouse, W.J.,
Wadsworth, A.E. Efficiency of α-ketoisocaproic acid as a substitute for leucine in the diet of the growing rat.
Am.J.Clin.Nutr. 1o5:798 (1975)

Lebenslauf

17. November 1949	geboren als Sohn der Eheleute Josef und Lydia Müller geb. Blodek in Halle an der Saale
1955	Im Rahmen der Familienzusammenführung Übersiedlung nach Wunsiedel/Bayern
1956-6o	Besuch der Grundschule
196o-69	Absolvierung des neusprachlichen Zweiges des Gymnasiums in Dormagen mit abschließendem Abitur
1969	Praktikum für das Medizinstudium an der Universitäts-Nervenklinik in Köln
197o-73	Vorklinisches Studium an der Universität Würzburg. Physikum
1973-77	Klinisches Studium an der Universität Würzburg. Ablegen des Staatsexamens
1978-79	Medizinalassistentenzeit in der Kurklinik Dr. Vötisch GmbH und im Kreiskrankenhaus Kitzingen
198o-81	Ableistung der für die Zulassung als Kassenarzt notwendigen Praxisvertretungen und Vorbereitung auf das A-Diplom der Deutschen Akademie für Akupunktur und Aurikulomedizin unter Leitung von Dr. med. Frank R. Bahr